10.22092/sppi.2022.357307.1242

"مجله نهال و بذر"
جلد ۳۷، شماره ۳، سال ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

اثر نیترات نقره و دوره تاریکی بر راندمان کشت بساک فلفل دلمه‌ای گلخانه‌ای (*Capsicum annuum* L.)

Effect of Silver Nitrate and Dark Period on Anther Culture Efficiency of Greenhouse Bell Pepper (*Capsicum annuum* L.)

محمدجواد زمانی[۱]، احمد معینی[۲] و رجب چوکان[۳]

۱- دانشجوی سابق دکتری اصلاح نباتات،گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، و استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۲- دانشیار،گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
۳- استاد، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۲ تاریخ پذیرش:۲۸ /۱۴۰۰/۰۷

چکیده

زمانی، م. ج.، معینی، ا. و چوکان، ر. ۱۴۰۰. اثر نیترات نقره و دوره تاریکی بر راندمان کشت بساک فلفل دلمه‌ای گلخانه‌ای (*Capsicum annuum* L.). **مجله نهال و بذر۳۷:** ۳۱۷-۳۳۳.

آندروژنز به خاطرکارایی زیاد و قابلیت اجرا در بسیاری از گونه‌های گیاهی پتانسیل بالایی برای استفاده در اصلاح نباتات دارد. در این راستا، کشت بساک معمول‌ترین روش القای هاپلوئیدی است که در برنامه‌های به نژادی به‌طور گسترده‌ای از آن استفاده می‌شود. در این پژوهش به منظور بهبود روش کشت بساک در فلفل دلمه‌ای، اثر چهار دوره تاریکی و پنج غلظت نیترات نقره بر روی چهار رقم هیبرید فلفل دلمه‌ای (کاملوت، اینسپیریشن، پلاتو و کالیفرنیوم) بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در هشت تکرار بررسی شدند. نتایج نشان داد که افزایش طول دوره تنش تاریکی از شش روز به ۱۰ روز، افزایش درصد بساک‌های جنین‌زا و نیز درصد گیاهچه‌های بازززایی‌شده را به همراه داشت. بیشترین میزان جنین‌زایی و بازززایی گیاه با استفاده از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره در محیط کشت CP و نگهداری بساک‌های کشت شده به مدت ۱۰ روز در تیمار تاریکی به دست آمد. نتایج نشان داد که بیشترین درصد بساک های جنین‌زا (۱۶/۶۶ درصد) در اثر متقابل بین رقم پلاتو و غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره به دست آمد. همچنین از میان غلظت‌های نیترات نقره مورد بررسی، بیشترین درصد گیاهچه‌های بازززایی شده (۱۱/۷۱٪) با استفاده از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: فلفل دلمه‌ای، آندروژنز، بازززایی گیاه، گیاهچه بازززایی شده، جنین‌زایی.

نگارنده مسئول: moieni_a@modares.ac.ir تلفن: ۰۲۱۴۸۲۹۲۰۰۲

مقدمه

فلفل (*Capsicum annuum* L.) یکی از گونه های مهم خانواده سولاناسه (Solanacea) است که تولید سالانه جهانی آن حدود ۴۶۰ هزار تن برآورد شده است. مهم‌ترین کشورهای تولید کننده فلفل در جهان به ترتیب عبارتند از چین، مکزیک، اندونزی، ترکیه، آمریکا و اسپانیا (FAO, 2020).

جنس Capsicum دارای ۲۲ گونه وحشی و پنج گونه اهلی است. گونه‌های اهلی درگیاه فلفل عبارتند از: *C. annuum* L.، *C. frutescens* L.، *C. chinense* L.، *C. baccatum* L.، *C. pubescens R.* (Eshbaugh, 1980; IBPGR, 1983). فلفل گیاهی خودگشن است اما بر اساس تعداد و میزان فعالیت زنبورها در طول دوره گرده‌افشانی، میزان دگرگشنی از ۸ تا ۱۵ درصد در این گیاه گزارش شده است (Greenleaf, 1986; George, 1999; Grubben and Denton, 2004). این دگرگشنی به دلیل مورفولوژی گل و یا میزان حضور برخی حشرات گرده‌افشان است (George, 1999).

در فلفل هر دو نوع بذر استاندارد (آزادگرده‌افشان) و هیبرید وجود دارد. اهداف به نژادی مهم در فلفل‌دلمه‌ای شامل عملکرد بیشتر، زودرسی، بهبود کیفیت میوه و مقاومت به آفات و بیماری‌ها است. اندازه، رنگ و شکل میوه، قابلیت انبارداری و طعم و نوع بافت از ویژگی‌های مهم در سنجش کیفیت میوه هستند (Frary and Sami, 2013). بذور هیبرید به‌خاطر قدرت رویشی و یکنواختی بیشتر، مقاومت در برابر برخی بیماری‌ها و تنش‌ها و نیز داشتن صفات مطلوب از اهمیت و کیفیت بیشتری برخوردار هستند.

در برنامه‌های متداول به نژادی تولید یک رقم ۱۰ تا ۱۵ سال طول می کشد. از سوی دیگر ناکارآمدی انتخاب در نسل‌های اولیه از معایب دیگر روش‌های به نژادی متداول است (Dunwell, 2010). در روش‌های به نژادی متداول دستیابی به لاین خالص از طریق خویش‌آمیزی و تلاقی‌های برگشتی متعدد حدود ۶ تا ۸ نسل امکان‌پذیر است، در حالی‌که با استفاده از دابلدهاپلوئیدی می‌توان این مدت را به شش ماه تا حداکثر یک سال کاهش داد.

روش‌های درون‌شیشه‌ای گوناگونی برای تولیدگیاهان هاپلوئید وجود داردکه به دو دسته اصلی آندروژنز (Androgenesis) و ژینوژنز (Gynogenesis) تقسیم می‌شوند. به فرآیند القاء و باززایی گیاه هاپلوئید با استفاده از سلول‌های گامتی نر "آندروژنز" گفته می‌شود. با توجه به کارایی بالا و قابلیت اجرای آندروژنز در بسیاری از گونه‌های گیاهی، پتانسیل زیادی برای استفاده از این روش در برنامه به نژادی و بهره‌برداری تجاری از هاپلوئیدهای مضاعف‌شده وجود دارد. از معایب این روش وابستگی زیاد آن به ژنوتیپ و سخت‌پاسخ‌دهی برخی گونه‌های مهم از نظر اقتصادی است. موفقیت در استفاده از این روش به توانایی میکروسپورها در تغییر مسیر از مرحله گامتوفیتی به مرحله اسپوروفیتی و در نتیجه تقسیمات متوالی سلول

جنسی و سپس تشکیل جنین یا کالوس بستگی دارد (Germanà, 2011).

آندروژنز به دو طریق کشت بساک و کشت میکروسپور انجام می‌شود. کشت بساک معمول‌ترین روش القای هاپلوئیدی است که در برنامه‌های به نژادی به‌طور گسترده از آن استفاده می‌شود (Murovec and Bohanec, 2012). اولین گزارش تولیدهاپلوئیدهای خودبه‌خودی در گیاه فلفل در سال ۱۹۴۳ ارائه شد (Christensen and Bamford, 1943) و اولین گزارش‌های کشت بساک‌های فلفل توسط سه گروه تحقیقاتی مستقل ارائه شدند (George and Narayanaswamy 1973; Kuo *et al.*,1973; Wang *et al.*, 1973). در زمینه کشت بساک فلفل تحقیق دیگری انجام شده که کیفیت و کمیت جنین‌های بدست آمده را افزایش داده است، این تحقیق پایه بسیاری از تحقیقات در این زمینه بوده است (Dumas de Vaulx *et al.*, 1981).

با استفاده از این پروتکل، تحقیقات مختلفی از جمله بررسی اثر ترکیب محیط کشت (Mityko' *et al.*, 1995; Mityko *et al.*, 1999)، مرحله رشد میکروسپور (Ozkum Ciner and Tipirdamaz 2002; Kim *et al.*, 2004)، ژنوتیپ و شرایط رشدی گیاهان بخشنده انجام شده‌اند (Kristiansen and Andersen 1993; Mityko and Fári, 1997). همچنین اثر تغییر منبع هیدرات کربن و تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی کشت بساک گیاه فلفل بررسی شده‌است (Gyulai *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004; Irikova *et al.*, 2011).

فلفل گیاهی با پاسخ‌دهی سخت نسبت به آندروژنز است و میزان پاسخ دهی بین صفر تا ۱۰ درصد را برای این گیاه گزارش کرده‌اند (Ercan and Ayar Şensoy, 2011; Segui-Simarro *et al.*, 2011). در گیاهان مختلف از جمله فلفل، ترکیبات مختلف محیط کشت از جمله نیتروژن معدنی یا آلی سبب تاثیرگزاری مستقیم بر روند پاسخ به آندروژنز شده است (Lu *et al.*, 2016; Gammoudi *et al.*, 2018). البته در بین انواع تیمارهای اعمال شده به منظور افزایش جنین‌زایی می‌توان به تیمار سرمایی نیز اشاره کرد که در این بین نتایج متناقضی مبنی بر افزایش و یا کاهش تولید جنین گزارش شده است (Ari *et al.*, 2016; Papova *et al.*, 2016).

یکی از مشکلات کشت بافت گیاهی تولید اتیلن توسط بعضی از بافت‌ها یا اندام‌های کشت‌شده است و این گاز به دلایلی از جمله آسیب‌دیدگی یا مواجهه ریزنمونه‌ها با بستر و شرایط محیطی جدید که به عنوان تنش عمل می‌کنند، تولید می‌شود (Yang and Hoffman, 1984). مهار تولید و یا عمل اتیلن می‌تواند به بهبود کشت بافت گیاهی کمک قابل ملاحظه‌ای نماید و برای این منظور از مواد مختلفی می‌توان استفاده کرد. یون‌های نقره (Ag^+) به عنوان مهارکننده‌ای قوی برای

جلوگیری از اثر اتیلن در گیاه شناخته شده‌اند (Lashermes, 1992)، به طوری که استفاده از نیرات نقره ($AgNO_3$)، با مهار کردن اثر سوء اتیلن می‌تواند تاثیر مثبتی روی جنین‌زایی گیاه داشته باشد (Niroula and Bimb, 2009).

القاء جنین‌زایی در حضور اکسین رخ می‌دهد ولی بیان ژن‌های مرتبط با جنین‌زایی و تشکیل جنین‌ها مستلزم حذف یا کاهش اکسین موجود در محیط کشت است که این حذف یا کاهش می‌تواند توسط نور و یا گرما صورت بگیرد (Guilfoyle *et al.*, 1993; Ali *et al.*, 2010). مطالعات نشان داده‌اند پاسخ به دوره تاریکی به‌شدت وابسته به ژنوتیپ بوده و ممکن است فرآیندهای پیچیده‌ای در ژنوتیپ‌های مختلف تحت تأثیر دوره تاریکی فعال یا غیرفعال شوند. از سوی دیگر محققان اظهار داشتند که قرار دادن بافت‌های گیاهی در تاریکی می‌تواند سبب محافظت تنظیم‌کننده‌های رشد و نیز دیگر ترکیبات حساس به نور موجود در بافت مورد مطالعه یا محیط کشت شوند (Jaiti *et al*., 1999; Habibzadeh *et al*., 2011).

بنابراین از کشت بساک می‌توان به‌طور موثری در برنامه‌های به نژادی برای تولیدلاین‌های هموزیگوت فلفل دلمه‌ای استفاده کرد. در این پژوهش، به منظور بهبود کشت بساک فلفل دلمه‌ای، اثر غلظت نیترات نقره و مدت زمان تاریکی در طی دوره انکوباسیون بر روی بهبود کارایی کشت بساک فلفل دلمه‌ای بررسی شد.

مواد و روش‌ها

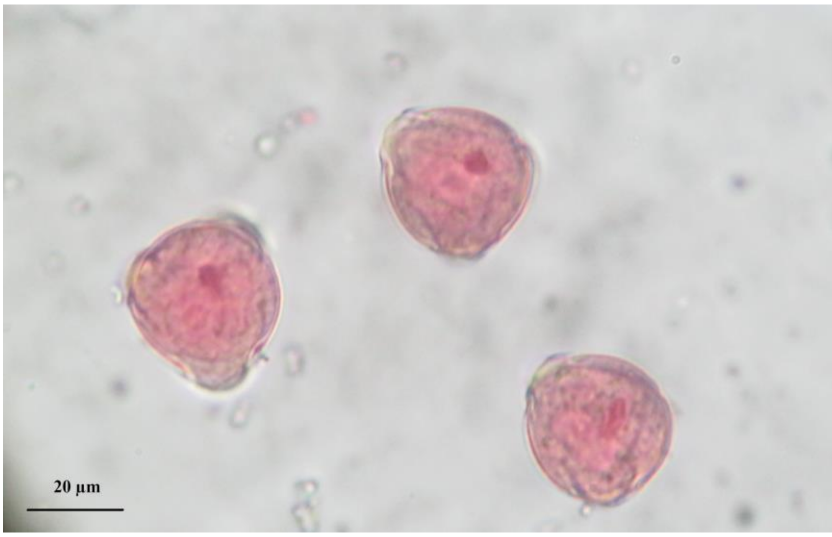
در این پژوهش از چهار رقم هیبرید تجاری فلفل دلمه‌ای (کاملوت، اینسپیریشن، پلاتو و کالیفرنیوم) که میزان واردات و نیز مصرف آنها در کشور زیاد است و به لحاظ رنگ و وجود مقاومت به برخی از بیماری‌ها تفاوت دارند، استفاده شد. به جز بذر رقم اینسپیریشن که از شرکت سپاهان رویش اصفهان تهیه شد، بذر بقیه ارقام از شرکت فلات ایران تهیه و استفاده گردید.

بذر گیاهان بخشنده بساک در سینی‌های نشاء با بستر خاک شنی و پیت ماس (۱:۱) کشت شدند. تولید نشاء و گیاهان مادری در شرایط گلخانه شیشه‌ای با تناوب ۱۶ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی انجام شد. درجه حرارت در طی دوره روشنایی ۲۸- ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در دوره تاریکی ۲۰- ۱۶ سانتی‌گراد بود. چهل روز پس از کشت بذور در سینی‌های کشت، نشاها در بستر اصلی در خاک لومی_شنی گلخانه کشت شدند و سپس گیاهان هفته‌ای یکبار توسط کود کامل N:P:K (۲۰:۲۰:۲۰) با غلظت چهار گرم در لیتر حاوی ریزمغذی‌ها تغذیه شدند. برای کنترل و مدیریت آفات، از حشره کش های دیکلروس، کنفیدور و اوبرون برای تریپس و مگس سفید و از حشره کش های نیورون و دانیتول برای کنه، با غلظت یک در ۱۰۰۰ استفاده شد.

برای انجام آزمایش، غنچه‌های گل با سایز مناسب در اوایل صبح برداشت شدند.

استریل‌کردن سطحی غنچه‌ها با هیپوکلریت سدیم ۲٪ (وزن به حجم) به همراه ۰/۰۵ ٪ توویین-۲۰ (حجم به حجم) انجام شد. برای این منظور، غنچه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در این محلول قرار داده شدند و سپس سه الی چهار مرتبه شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. پس از جداکردن بساک‌ها از غنچه‌ها، بساک‌ها در پتری دیش‌های یکبار مصرف (۱۵ × ۶۰ میلی‌متر) کشت شدند.

مرحله رشد و نموی میکروسپور به وسیله رنگ‌آمیزی با رنگ استوکارمن انجام شد (Summer, 1994). از طریق رنگ‌آمیزی غنچه‌های گل حاوی میکروسپورهای در مراحل اواخر تک‌هسته‌ای تا اوایل دوهسته‌ای شناسایی شدند (شکل ۱) و برای آنها نشانگرهای مورفولوژیک تعیین شد (کاسبرگ‌ها هم‌اندازه گلبرگ‌ها و یا اندکی کوچکتر از گلبرگ‌ها بودند و نیز بساک‌ها انتهای ارغوانی رنگ داشتند). اواخر مرحلهٔ تک‌هسته‌ای میکروسپور یکی از مراحل مناسب کشت است. پس از اعمال تیمار القایی برخی میکروسپورها القاءشده و مسیر جنین‌زایی را با تشکیل ساختارهای چندسلولی آغاز می‌کنند. پس از القاء، جنین‌های کوچک سفید کروی و اژدری شکل مشاهده شده‌اند (Barany *et al.*, 2001).



شکل ۱- میکروسپورهای فلفل دلمه‌ای در مرحله تک هسته‌ای

Fig. 1. Bell pepper microspores at the uninucleate stage

برای کشت بساک‌ها، از محیط کشت CP جامد (Dumas de Valux*et et al.*, 1981) دارای هشت گرم در لیتر آگار-آگار استفاده شد. به منظور افزایش درصد جنین‌زایی و باززایی گیاه در ارقام مورد بررسی، پروتکل اصلی کشت بساک فلفل

(Dumas de Valux*et et al.*, 1981) تغییر داده شد. اعمال تغییراتی در این پروتکل منجر به تولید جنین و گیاه شد. در این آزمایش بساک‌ها به مدت شش روز در تاریکی و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت جامد CP حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و کینتین به همراه ۳۰ گرم در لیتر مالتوز کشت شدند.

در آزمایش اول، اثر مدت دوره تاریکی (۶، ۸، ۱۰ و ۱۲روز) بر روی هر چهاررقم مورد آزمایش بررسی شد. البته همانگونه که ذکر شد در شش روز اول دوره تاریکی بساک‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند و در صورت نیاز برای اعمال بقیه تیمارهای تاریکی به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در آزمایش دوم، اثر پنج غلظت نیترات نقره (۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت بساک با استفاده از بهترین مدت زمان تیمار تاریکی مشخص شده در آزمایش قبلی روی القاء جنین و باززایی گیاه بررسی شد. سپس بساک‌های کشت شده به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روشنایی ۳۰۰۰ لوکس و رعایت تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت شش روز (روی همان محیط کشت اولیه) منتقل شدند. در ادامه انتقال بساک‌ها به محیط کشت R_1 دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و درنهایت تعویض محیط کشت R با محیط کشت تازه هر ۲۰ روز یک بار انجام شد.

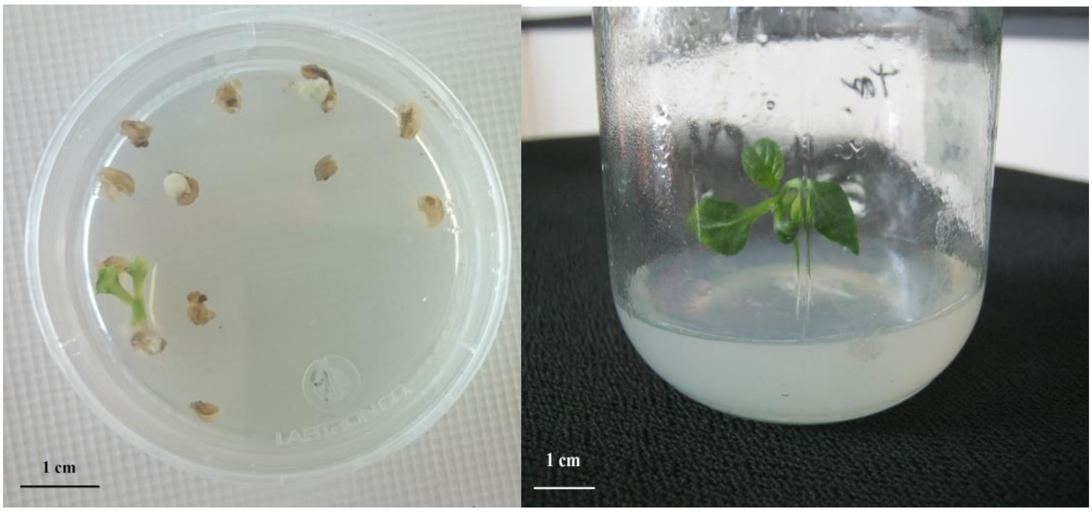
اولین جنین‌ها، حدود ۵۰ روز پس از کشت بساک‌ها ظاهر شدند. پس از ۵۰ تا ۶۰ روز تعداد بساک‌های تولیدکننده کالوس تعداد بساک‌های جنین‌زا وتعداد گیاهچه‌های باززایی‌شده به ازای بساک‌های کشت‌شده یادداشت‌برداری شد. سپس برای رشد و نمو بهتر، گیاهچه‌های باززایی شده با ارتفاع ۹-۷ میلی‌متر به محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی در ظروف شیشه‌ای (۹۵ × ۷۵ میلی‌متر) حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت انتقال داده شدند. زمانی که گیاهچه‌های باززایی‌شده به ارتفاع ۷-۵ سانتی‌متر رسیدند، به بستر حاوی پیت ماس و خاک (۱:۱) استریل‌شده انتقال یافتند. سازگارکردن گیاهان به مدت ۱۰ روز در شرایط گلخانه و در دمای ۲۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد و با رطوبت نسبی ۸۰ درصد انجام شد.

آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با هشت تکرار انجام شدند. . هر تکرار یک پتری‌دیش حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط کشت که در آن ۱۲ بساک قرارداشت، بود. مقایسه میانگین ها با استفاده از روش حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

به‌طورکلی، اولین جنین‌ها به اندازه حدود ۲-۳ میلی‌متر حدود ۵۰ روز پس از کشت بساک‌ها شروع به ظاهر شدن کردند. سپس این جنین‌ها به تدریج به گیاهچه‌های

دارای برگ و ریشه تبدیل شدند. این گیاهچه‌ها به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی منتقل شدند (شکل ۲).



شکل ۲- باززایی گیاه درکشت بساک فلفل دلمه ای

Fig. 2. Plant regeneration in bell pepper anther culture

تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر متقابل دوره تاریکی × رقم بر درصد بساک‌های کالوس‌زا، درصد بساک‌های جنین‌زا و درصد گیاهچه‌های باززایی شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین ها نشان داد که بیشترین درصد بساک‌های کالوس‌زا (۸۰/۲۵ درصد) در تیمار ۱۲ روز تاریکی در رقم کالیفرنیوم و کمترین میزان آن (۵۷/۲۹ درصد) در رقم پلاتو و در تیمار شش روز تاریکی مشاهده شد (جدول ۲). نتایج نشان داد با افزایش طول دوره تاریکی از شش روز به ۱۰ روز درصد بساک‌های جنین‌زا و نیز درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده بیشتر شد و این افزایش در ارقام مختلف، متفاوت بود (جدول ۲). همچنین با افزایش دوره تاریکی از ۱۰ روز به ۱۲ روز میزان این صفات کاهش یافتند، در حالی که درصد بساک‌های کالوس‌زا افزایش یافت و این افزایش در رقم کالیفرنیوم بسیار بیشتر بود (جدول ۲). این امر می‌تواند به دلیل پتانسیل ژنتیکی این رقم برای پاسخ بساک به کالوس‌زایی باشد.

نور نقش زیادی در تمایز سلولی دارد و این موضوع می‌تواند توجیه خوبی برای افزایش کالوس زایی به موازات افزایش طول دوره تاریکی باشد. به‌طور کلی روشنایی و تاریکی روی القای کالوس‌زایی و نیز رشد و توسعه کالوس‌های به دست آمده تأثیر دارند و در اکثر موارد کالوس‌زایی در تاریکی

انجـام می‌شـود. در کشـت درون شیشـه‌ای، تعادل عمل هورمون هـای اکسـین و سـیتوکینین نقـش بسـیار مهمـی دارد و نسـبت مناسـب ایـن هورمون‌هـا باعـث کنتـرل تقسـیم سـلولی و ریخت‌زایی سلول می‌شود، ایـن در حـالی اسـت که برخی عوامل از جمله نور و گرمـا می‌تواننـد سـبب بـه هـم خـوردن ایـن تعـادل شـوند (Moubayidin *et al*., 2009).

جدول۱- تجزیه واریانس برای اثر دوره تاریکی و رقم روی کشت بساک فلفل دلمه‌ای

Table 2. Analysis of variance for the effect of dark period and cultivar on bell pepper anther culture

S.O.V.	منبع تغییرات	درجه آزادی d.f.	Mean square میانگین مربعات درصد بساک‌های کالوس‌زا Callogenic anthers (%)	درصد بساک‌های جنین‌زا Embryogenic anthers (%)	درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده Regenerated plantlets (%)
Cultivar (C)	رقم	3	257.884**	0.018	0.007
Dark period (D)	دوره تاریکی	3	349.030**	0.045**	0.059
(C × D)	اثر متقابل	9	32.913**	0.004**	0.004**
Error	اشتباه آزمایشی	112	72.880	0.002	0.001
C. V. (%)	درصد ضریب تغییرات		13.29	11.15	12.15

**: Significant at the 1% probability level.

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × دوره تاریکی بر روی کشت بساک فلفل دلمه‌ای

Table 3. Mean comparison for cultivar × dark period interaction effect on bell pepper anther culture

Cultivar	رقم	دوره تاریکی (روز) Dark period (day)	درصد بساک‌های کالوس‌زا Callogenic anthers (%)	درصد بساک‌های جنین‌زا Embryogenic anthers (%)	درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده Regenerated plantlets (%)
Kamelot	کاملوت	6	58.33	1.04	1.04
Kamelot	کاملوت	8	58.33	4.16	2.08
Kamelot	کاملوت	10	58.33	6.25	5.21
Kamelot	کاملوت	12	65.63	4.16	3.12
Plato	پلاتو	6	57.29	2.08	1.04
Plato	پلاتو	8	61.46	4.16	3.12
Plato	پلاتو	10	62.50	6.25	4.16
Plato	پلاتو	12	66.67	3.12	3.12
Inspiration	اینسپیریشن	6	62.50	3.12	1.04
Inspiration	اینسپیریشن	8	64.58	4.16	4.16
Inspiration	اینسپیریشن	10	64.58	5.21	4.16
Inspiration	اینسپیریشن	12	69.79	2.08	1.04
Californium	کالیفرنیوم	6	62.50	4.16	1.04
Californium	کالیفرنیوم	8	63.54	5.21	3.12
Californium	کالیفرنیوم	10	69.79	8.33	4.16
Californium	کالیفرنیوم	12	80.25	5.21	2.08
LSD 5%			12.13	0.04	0.04
LSD 1%			15.95	0.06	0.05

نور نقش زیادی در تمایز سلولی دارد و این موضوع می‌تواند توجیه خوبی برای افزایش کالوس‌زایی به موازات افزایش طول دوره تاریکی باشد. به‌طور کلی روشنایی و تاریکی روی القای کالوس‌زایی و نیز رشد و توسعه کالوس‌های بدست آمده تاثیر دارند و در اکثر موارد کالوس‌زایی در تاریکی انجام می‌شود (Dunlap and Robacker, 1988; Leuba *et al.*, 1989). القاء جنین‌زایی در حضور هورمون اکسین رخ می‌دهد ولی بیان ژن‌های مرتبط با جنین‌زایی و تشکیل جنین‌ها مستلزم حذف یا کاهش اکسین موجود در محیط کشت است، این حذف یا کاهش می‌تواند توسط نور ویا گرما صورت بگیرد (Guilfoyle *et al.*, 1993; Ali *et al.*, 2010).

در پژوهشی از تیمار دوره تاریکی برای القای کالوس در کشت بساک گیاه نخود استفاده شد و نتایج نشان داد که با استفاده از این تیمار می‌توان پاسخ به آندروژنز را بهبود بخشید (Tang *et al.*, 2009). نتایج بدست آمده از این پژوهش نیز گواه این واقعیت است که افزایش طول دوره تاریکی بعد از ۱۰ روز سبب افزایش کالوس زایی شد. هرچند در مطالعه دیگری روی کشت بساک خیار نشان داده شده است که تفاوت معنی‌داری بین تیمار نور و تاریکی در پاسخ به آندروژنز وجود نداشت، اما این تفاوت با مطالعه حاضر میتواند به دلیل تفاوت در نوع گیاه مورد مطالعه و یا عدم وجود تفاوت در میان ژنوتیپ‌های خیار در پاسخ به تیمار تاریکی باشد (Song and Luo, 2007).

تجزیه واریانس داده ها نشان داد اثر غلظت نیترات نقره و رقم بر درصد بساک‌های کالوس‌زا، درصد بساک‌های جنین‌زا و درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). در حالی که اثر متقابل غلظت نیترات نقره × رقم فقط بر درصد بساک‌های جنین‌زا در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳).

جدول۳- تجزیه واریانس برای اثر نیترات نقره و رقم روی کشت بساک فلفل دلمه‌ای

Table 2. Analysis of variance for the effect of silver nitrate and cultivar on bell pepper anther culture

S.O.V.	منبع تغییرات	درجه آزادی d.f.	Mean square میانگین مربعات درصد بساک‌های کالوس‌زا Callogenic anthers (%)	درصد بساک‌های جنین‌زا Embryogenic anthers (%)	درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده Regenerated plantlets (%)
Cultivar (C)	رقم	3	181.713**	0.018**	0.023**
$AgNO_3$ concentration (A)	غلظت نیترات نقره	4	429.906**	0.097**	0.158**
C × A	اثر متقابل رقم × غلظت نیترات نقره	12	8.464	0.012**	0.006
Error	اشتباه آزمایشی	140	20.978	0.001	0.002
C. V. (%)	درصد ضریب تغییرات		6.95	9.31	13.29

**: Significant at the 1% probability level.

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

مقایسه میانگین ها نشان داد که بیشترین میزان درصد بساک‌های کالوس‌زا (۶۸/۵۴ درصد) در رقم اینسپیریشن مشاهده شد (جدول ۴). کمترین میزان این صفت در رقم کاملوت (۶۲/۲۹ درصد) بود. بیشترین میزان درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده در رقم پلاتو (۷/۴۹ درصد) و کمترین میزان برای این صفت در رقم کاملوت (۵/۲۰ درصد) به دست آمد (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین برای درصد بساک‌های کالوس‌زا و گیاهچه‌های باززایی‌شده در چهار رقم فلفل دلمه‌ای

Table 4. Mean comparison for callogenic anthers (%) and regenerated plantlets (%) in four bell pepper cultivars

		Cultivar رقم			
Trait	صفت	کاملوت Kamelot	پلاتو Plato	اینسپیریشن Inspiration	کالیفرنیوم Californium
Callogenic anthers (%)	درصد بساک‌های کالوس‌زا	62.29	64.37	68.12	68.54
		LSD 1%		3.81	
		LSD 5%		2.89	
Regenerated plantlets (%)	درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده	5.20	7.49	4.78	6.24
		LSD 1%		0.04	
		LSD 5%		0.03	

مقایسه میانگین ها نشان داد که بیشترین درصد بساک‌های کالوس‌زا (۷۴/۲۱ درصد) با استفاده از غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره به دست آمد (جدول ۵).کمترین میزان این صفت (۶۱/۱۹ درصد) در محیط کشت فاقد نیترات نقره (شاهد) مشاهده شد. از طرف دیگر، درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده، بیشترین میزان (۱۱/۷۱ درصد) با استفاده از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره به دست آمد و کمترین میزان این صفت (۲/۳۴ درصد) در حضور ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره مشاهده شد (جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه میانگین درصد بساک‌های کالوس‌زا وگیاهچه‌های باززایی‌شده ارقام فلفل دلمه ای در پنج غلظت نیترات نقره

Table 5. Mean comparison of callogenic anthers (%) and regenerated plantlets (%) in bell pepper cultivars at five concentrations of silver nitrate

		Silver nitrate (mg l^{-1}) غلظت نیترات نقره (میلی گرم در لیتر)				
Trait	صفت	0	5	10	15	20
Callogenic anthers (%)	درصد بساک‌های کالوس‌زا	61.19	62.24	64.58	66.92	74.21
			LSD 5%		3.23	
			LSD 1%		4.25	
Regenerated plantlets (%)	درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده	3.90	4.68	11.71	7.03	2.34
			LSD 5%		0.03	
			LSD 1%		0.01	

درخصـــوص درصـــد بســـاک‌های جنـــین‌زا، بیشـــترین میـــزان (۱۶/۶۶ درصـــد) در تیمـــار ۱۰ میلی‌گـرم در لیتـر نیتـرات نقـره در رقـم پلاتـو مشاهده شـد (جـدول ۶). نتـایج یـک تحقیـق در خصوص اثر غلظت نیترات نقره در کشت بساک در فلفل رقم مالاتیا نشان داد کـه بهتـرین درصـد تولید جنین (۱۲/۵ درصد) در محیط کشـت فاقـد نیترات نقره و بدون تیمار سرمایی بـه دسـت آمـد (Ozkum Cyner and Tipirdamaz, 2002) که از بیشترین میزان جنین‌زایی در پژوهش حاضر کمتـر بـود و خـود دلیلـی بـر بهبـود تولیـد جنـین با استفاده از نیتـرات نقـره اسـت. از سـوی دیگـر در تحقیقـی در کشـت بسـاک گیـاه تـوت‌فرنگی بـــالاترین درصـــد تولیـــد جنـــین بـــا اســـتفاده از ۱۵ میلی‌گـرم نیتـرات نقـره بـه دسـت آمـد (Shahvali-Kohshour *et al.*, 2013) کـه البتـه این تفاوت با نتـایج پـژوهش حاضـر می‌توانـد بـه دلیل تفاوت در نوع گیاه مورد کشت باشد.

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × نیترات نقره بر درصد بساک‌های جنین‌زای فلفل دلمه‌ای

Table 6. Mean comparison of cultivar × silver nitrate interaction effect on embryogenic anthers (%) of bell pepper

Cultivar	رقم	نیترات نقره (میلی‌گرم در لیتر) Silver nitrate (mg l^{-1})	درصد بساک‌های جنین‌زا Embryogenic anthers (%)
Kamelot	کاملوت	0	5.21
Kamelot	کاملوت	5	5.21
Kamelot	کاملوت	10	12.50
Kamelot	کاملوت	15	12.50
Kamelot	کاملوت	20	4.16
Plato	پلاتو	0	4.16
Plato	پلاتو	5	8.33
Plato	پلاتو	10	16.66
Plato	پلاتو	15	12.50
Plato	پلاتو	20	4.16
Inspiration	اینسپیریشن	0	6.25
Inspiration	اینسپیریشن	5	4.16
Inspiration	اینسپیریشن	10	10.41
Inspiration	اینسپیریشن	15	7.29
Inspiration	اینسپیریشن	20	4.16
Californium	کالیفرنیوم	0	5.21
Californium	کالیفرنیوم	5	7.29
Californium	کالیفرنیوم	10	12.50
Californium	کالیفرنیوم	15	9.38
Californium	کالیفرنیوم	20	8.33
LSD 5%			0.05
LSD 1%			0.06

در فرآیند کشت بافت گیاهی به علت کشت ریزنمونه‌ها در ظروف در بسته، ترکیباتی از جمله اتیلن در ظروف تجمع پیدا کرده و مانع رشد گیاهچه‌ها می‌شوند (Mele *et al.*,1982). اتیلن تولید شده توسط مواد گیاهی در کشت درون شیشه‌ای قادر است که روی مورفولوژی گیاه تاثیر بگذارد (Brar *et al.*, 1999). برای رفع این مشکل می‌توان از مواد مختلفی از جمله نیترات نقره استفاده کرد. یون‌های نقره در فرم نیترات، برای مثال در $AgNO_3$، تاثیر زیادی در افزایش جنین‌زایی سوماتیکی، تشکیل نوساقه و نیز ریشه دارند (Bais *et a.*, 2000a; Bais *et al.*, 2000b). نیترات نقره یک بازدارنده با ارزش در کاهش عمل هورمون اتیلن و در نتیجه بهبود رشد گیاهچه‌ها به‌شمار می‌رود (Cristea *et al.*, 2012).

تولید جنین می‌تواند با تغییر اجزای مختلف محیط کشت بساک بویژه با اضافه کردن نیترات نقره تغییر یابد. به طوری که نیترات نقره کارایی باززایی گیاه را در کشت‌های کالوس ذرت افزایش داد (Bhojwani and Razdan, 1996). در زمینه محدود کردن اثر اتیلن، استفاده از نیترات نقره به‌منظور افزایش عملکرد تولید جنین در فلفل پاپریکا توصیه شده است (Buyukalaca *et al.*, 2004) که البته با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. همچنین در کشت بساک توتون، نیترات نقره باعث افزایش اندکی در تولید جنین شد (Dunwell and Powell, 1987). علاوه بر این نیترات نقره بر روی درصد ریزنمونه‌های جنین‌زا و نیز تعداد جنین‌های سوماتیکی در گندم دوروم تاثیر مثبت داشت که این موضوع نیز با نتایج پژوهش حاضر در فلفل دلمه ای هم خوانی دارد (Fernandez *et al.*, 1999).

بطور کلی افزایش طول دوره تنش تاریکی از شش روز به ۱۰ روز، افزایش درصد بساک‌های جنین‌زا و نیز درصد گیاهچه‌های باززایی‌شده را به همراه داشت. بیشترین میزان جنین‌زایی و باززایی گیاه با استفاده از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره در محیط کشت CP و نگهداری بساک‌های کشت شده به مدت ۱۰ روز دوره تاریکی به دست آمد. البته میزان پاسخ‌دهی ارقام مختلف به انواع تیمارها متفاوت بود که حساسیت رقم و پتانسیل ژنتیکی رقم می تواند از دلایل آن باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان بدینوسیله مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و نیز موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر برای همکاری‌های صمیمانه ایشان در اجرای این پژوهش سپاسگزاری می کنند.

References

Ali, S., Khan, M. S., and Iqbal, J. 2010. Genotype independent in vitro regeneration system in elite varieties of sugarcane. Pakistan Journal of Botany 42 (6): 3783-3790.

Ari, E., Bedir, H., Yildirim, S., and Yildirim, T. 2016. Androgenic responses of 64 ornamental pepper (*Capsicum annuum L.*) genotypes to shed-microspore culture in autumn season. Turkish Journal of Biology 40: 706-717.

Bais, H. P., Sudha, G., and Ravinshankar, G. A. 2000a. Putrescine and $AgNO_3$ influences shoot multiplication in vitro flowering and endogenous titres of polyamines in *Chichorium intybus* L. cv. Lucknow Local. Journal of Plant Growth Regulation 19: 238-248.

Bais, H. P., Sudha, G., Suresh, B., and Ravinshankar, G. A. 2000b. $AgNO_3$ influences in vitro root formation in Decalepis hamiltonii Wight, Arn. Current Science 79: 894-898.

Barany, I., Testillano, P. S., Mityko, J., and Risueno, M. C. 2001. The switch of the microspore developmental programme in Capsicum involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. International Journal of Biology Development 45: S39-S40.

Bhojwani, S., and Razdan, M. 1996. Plant tissue culture: Theory and practice. Revised Edition. Elsevier Science 39: 167-213.

Brar, M. S., Moore, M. J., Al khayri, J. M., Morelock, T. E., and Anderson, E. J. 1999. Ethylene inhibitors promote in vitro regeneration of cowpea (*Vigna unguiculata* L.). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 35 (3): 222-225.

Buyukalaca, S., Comlekcioglu, N., Abak, K., Ekbic, E., and Kilic, N. 2004. Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. European Journal of Horticulture Science 69: 206-209.

Christensen, H. M., and Bamford, R. 1943. Haploids in twin seedlings of pepper, *Capsicum annuum* L. Journal of Heredity 34: 99-104.

Cristea, T. O., Leonte, C., Brezeanu, C., Brezeanu, M., Ambarus, S., Calin, M., and Prisecaru, M. 2012. Effect of $AgNO_3$ on androgenesis of *Brassica oleracea* L. anthers cultivated in vitro. African Journal of Biotechnology 11 (73): 13788-13795.

Dumas de Vaulx, R., Chambonnet, D., and Pochard, E. 1981. Culture in vitro d'anthéres de piment (*Capsicum annuum* L.) amelioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements á +35°C. Agronomie 1: 859-864.

Dunlap, J. R., and Robacker, K. M. 1988. Nutrient salts promote light induced degradation

of indole-3-acetic acid in tissue culture media. Plant Physiology 88: 379-381.

Dunwell, J. M., and Powell, W. 1987. Anther culture of *Hordeum vulgare* L.: A genetic study of microspore callus production and differentiation. Theoretical and Applied Genetics 74: 60-64.

Dunwell, J. M. 2010. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnol Journal 8: 377-424.

Ercan, N., and Ayar Şensoy, F. 2011. Androgenic responses of different (*Capsicum annuum* L.) cultivars. Biyoloji Bilimleri Arastirma Dergisi 4: 59-61.

Eshbaugh, W. H. 1980. The taxonomy of the genus *Capsicum* (Solanaceae). Phytologia 47: 153-165.

FAO, 2020. The state of food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 210 pp.

Fernandez, S., Michaux-Ferriere, N., and Coumans, M. 1999. The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Journal of Plant Growth Regulation 28:147-155.

Frary, A. and Sami, D. 2013. Eggplant. pp. 117-137. In: Kang, B. C., and Kole, C. (eds.) Genetics, genomics and breeding of peppers and eggplants. Vol. 2. CRC Press. Taylor and Francis Group.

Gammoudi, N., Pedro, T., Ferchichi, A., and Gisbert, C. 2018. Improvement of regeneration in pepper: A recalcitrant species. Invitro Cellular and Development Biology-Plant 54: 145-153.

George, L., and Narayanaswamy, S. 1973. Haploid Capsicum through experimental androgenesis. Protoplasma 78: 467-470.

George, R. A. T. 1999. Vegetable seed production. CABI Publishing. 327 pp.

Germanà, M. A. 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 104: 283-300.

Greenleaf, W. H. 1986. Pepper breeding. pp. 67- 134. In: Bassett, M. (ed.) Breeding of vegetable crops. AVI Publishing Company, INC.

Grubben, G. H. J., and Denton, O.A. 2004. Plant Resources of Tropical Africa, Vegetables. Prota Foundation/ Backhuys Publishers/CTA Wageningen, Netherlands. 161 pp.

Guilfoyle, T. J., Hagen, G., Li, Y., Ulmasov, T., Liu, Z. B., Strabala, T., and Gee, M. 1993. Auxin-regulated transcription. Australian Journal of Plant Physiology 20:

489-502.

Gyulai, G., Gémes Juhász, A., Sági, Z., Venczel, G., Pintér, P., Kristóf, Z., Törjék, O., Heszky, L., Bottka, S., Kriss, J., and Zatykó, L. 2000. Doubled haploid development and PCR analysis of F1 hybrid derived DH-2-R paprika *(Capsicum annuum* L.) lines. Journal of Plant Physiology 156: 168-174.

Habibzadeh, S., Shariatpanahi, M. E., Amiri, R., Emamifar, M., Oroojloo, M., Nematzadeh, G., Sadat Noori, S. A., and Heberle-Bors, E. 2011. Effect of 2,4-D as a novel inducer of embryogenesis in microspores of *Brassica napus L*. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 47 (3): 114-122.

IBPGR, 1983. Genetic resources of capsicum. International Board for Plant Genetic Resources. AGPG/IBPGR/82/12. Rome, Italy. 49 pp.

Irikova, T., Grozeva, S., and Rodeva, V. 2011. Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro. Acta Physiolgiae Plantarum 33: 1559-1570.

Jaiti, F. J., Benlhabib, O., Sharma, H. C., EI Jaafari, S., and EI Hadrami, I. 1999. Genotypic variation in anther culture and effect of ovary coculture in durum wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59: 71-76.

Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D. I., and Lee K. M. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryo in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 63-72.

Kristiansen, K., and Andersen, S. B. 1993. Effects of donor plant, temperature, photoperiod and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. Euphytica 67: 105-109.

Kuo, J. S., Wang, Z. Z., Chien, N. F., Ku, S. J., Kung, M. L., and Hsu, H. C. 1973. Investigations on the anther culture in vitro of *Nicotiana tabacum* L. and *Capsicum annuum* L. Acta Botanica Sinica 15: 43-47.

Lashermes, P. 1992. Improved anther culture method for obtaining direct regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Genetic Breeding 51: 295-301.

Leuba, V., Le Tourneau, D., and Brown, J., 1989. Stability of phenyl acetic acid in liquid media. Journal of Plant Growth Regulation 8: 163-165.

Lu, R. Chen, Z., Goa, R., He, T., Wang, Y., Xu, H., Guo, G., Li, Y., Liu, Ch., and Huang, J. 2016. Genotypes-independent optimization of nitrogen supply for isolated microspore cultures in barley. BioMed Research International. DOI.Org/10.1155/2016/1801646

Mele, E., Messeguer, J., and Camprubi, P. 1982. Effect of ethylene on carnation

explants grown in sealed vessels. pp. 69-70. In: Fujiwara, A. (ed.) Plant tissue culture. Tokyo, Japan.

Mityko, J., Andrasfalvy, A., Csillery, G., and Fári. M. 1995. Anther-culture in different genotypes and F_1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Breeding 114: 78-80.

Mityko, J., and Fári, M. 1997. Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther and microspore culture. Acta Horticulture 447: 281-287.

Mityko, J., Szabó, L., and Barnabás, B. 1999. Cholchicine induced ultra structural changes in barley and pepper microspores. Journal of Slovak Academy Science 54: 24-25.

Murovec, J., and Bohanec, B. 2012. Haploids and doubled haploids in plant breeding. Plant Breeding: 87-106.

Moubayidin, L., Di Mambro, R., and Sabatini, S. 2009. Cytokinin auxin crosstalk. Trends in Plant Science 14: 557-562.

Niroula, R. K., and Bimb H. P. 2009. Effect of genotype and callus induction medium on green plant regeneration from anther of Nepalese rice cultivars. Asian Journal of Plant Science 8: 368-374.

Ozkum Cyner, D., and Tipirdamaz, R. 2002. The effects of cold treatment and charcoal on the in vitro androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). Turkish Journal of Botany 26: 131-139.

Popova, T., Grozeva, S., Todorova, V., Stankova, G., Anachkov, N., and Rodeva, V. 2016. Effects of low temperature, genotype and culture media on in vitro androgenic answer of pepper (*Capsicum annuum L*.). Acta Physiologia Plantarum 38: 273.

Segui-Simarro, J. M., Corral-Martinez, P., Parra-Vega, V., and Gonzalez Garcia, B. 2011. Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. Plant Cell Reports 30: 765-778.

Shahvali-Kohshour, R., Moieni, and A., Baghizadeh, A. 2013. Positive effects of cold pre-treatment, iron source, and silver nitrate on anther culture of strawberry (*Fragaria*×*ananassa* Dusch). Plant Biotechnology Report 7: 481-488.

Song, H., Lou, Q. F., and Luo, X. D. 2007. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber *(Cucumis sativue L.).* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 90: 245-254.

Summer, A. T. 1994. Chromosome banding and identification absorption staining. pp. 59-81. In: Gosden, J. R. (ed.) Chromosome analysis protocols. Humana Press.

Totowa, New Jersey.

Tang, Y., Li, H., Liu, J., Liu, B., and Lou, H. 2009. Callus formation from anther culture in baldam pear (*Momordica charantia* L.). Agriculture and Environmental Science 6 (3): 308-312.

Wang, Y. Y., Sun, C. S., Wang, C. C., and Chen, N. F. 1973. The induction of pollen plantlets of triticale and *Capsicum annum* from anther culture. Scientia Sinica 16: 147-151.

Yang, S. F., and Hoffman, N. E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annual Review of Plant Physiology 35: 155-189.